

**МОРФОГЕНЕЗ КРЮЧЬЕВ И УЛЬТРАСТРУКТУРА ЖЕЛЕЗЫ
ПРОНИКНОВЕНИЯ В ОНКОСФЕРАХ PASSERILEPIS CRENATA
(CESTODA : CYCLOPHYLLIDEA)**

© Е. Е. Корнакова

Изучены морфогенез крючьев и ультраструктура железы проникновения у *Passerilepis crenata*. Показано, что развитие крючьев происходит в специализированных клетках, онкоблестах, которые не дегенерируют вплоть до полного формирования онкосферы. Ранний зачаток крючка трехслойный, впоследствии наружный слой в области лезвия приобретает повышенную электронную плотность и к моменту окончания морфогенеза крючок в области лезвия становится двуслойным. Показано, что крючья на всем протяжении морфогенеза окружены мембраной онкоблеста. В области основания отростка крючок окружен цитоплазматической структурой, «воротничком». Эмбриональный эпителий образует глубокие инвагинации внутрь эмбриона, каждая из которых чехлом окружает лезвие крючка. Показано, что «воротничок» образован отростком миоцитона, окружающим основание отростка и соединенным кольцевой септированной десмосомой с эпителиальным чехлом, окружающим лезвие крючка. Двудольная железа проникновения образует гранулы одного типа. Она имеет от 1—2 до 8 протоков, соединяющихся не с эмбриональным эпителием, а с инвагинациями внутренней оболочки, пронизывающими эмбриональный эпителий.

В то время как ультраструктура и развитие оболочек онкосферы у циклофиллидных цестод к настоящему времени изучены на обширном круге видов, только несколько исследований было посвящено морфогенезу крючьев онкосферы. Ультраструктура железы проникновения у онкосфер цестод также изучена недостаточно. Большинство работ по изучению морфогенеза онкосферы было проведено на нескольких популярных видах. Поэтому данное исследование морфогенеза крючьев и ультраструктуры железы проникновения у *Passerilepis crenata*, относящегося к малоисследованному кругу видов циклофиллид с «сухопутным» жизненным циклом, паразитирующих у птиц, является важным для выявления общих закономерностей эмбриогенеза у циклофиллидных цестод.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Экземпляры *P. crenata* были собраны из кишечника скворца (*Sturnus vulgaris* L.) и черного дрозда (*Turdus merula* L.) в окрестностях Калининградской биологической станции ЗИНа РАН, на Куршской косе Балтийского моря. Фрагменты стробил с маточными и зрелыми члениками размером около 1.5 мм были зафиксированы в 4 %-ном глутаральдегиде на 0.1 М какодилатном буфере (pH 7.4) с добавлением сахарозы и постфиксированы после отмытки в том же буфере в 1 %-ном растворе OsO₄.

Ультратонкие срезы приготовлены на ультрамикротоме LKB—III и окрашены в водном насыщенном растворе уранилацетата и растворе цитрата свинца по Рейнольдсу. Просмотр срезов проведен на микроскопе JEM 1200 EX.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Формирование крючьев онкосфер в эмбрионах *Passerilepis crenata* происходит на ранней стадии развития онкосферы и предшествует формированию эмбриофора и полному отделению эмбрионального эпителия.

Шесть онкобластов образуют группу клеток, симметрично расположенных на поперечных срезах (рис. 1, *а*; см. вкл.). Каждый онкобласт содержит крупное ядро с центрально расположенным ядрышком. На ранних стадиях морфогенеза крючьев цитоплазма онкобластов богата свободными рибосомами, содержит многочисленные крупные митохондрии и комплекс Гольджи. Зачаток крючка состоит из трех слоев: наружного гранулярного, среднего фиброзного с высокой электронной плотностью и внутреннего кристаллоидного (рис. 1, *б*; 5, *а*). Позднее наружный гранулярный слой в области лезвия становится плотным и сливается со средним в структуру единой плотности (рис. 2, *а*; см. вкл.; 5, *в*, *г*). Зачаток крючка окружен многочисленными микротрубочками, расположенными вдоль продольной оси крючка (рис. 1, *б*). Когда зачаток крючка вытягивается, микротрубочки прикрепляются к поверхности проксимальной области рукоятки (рис. 3, *а*, *в*; см. вкл.).

В процессе морфогенеза крючьев та часть внутренней оболочки онкосферы, которая впоследствии формирует эмбриональный эпителий, образует глубокие инвагинации внутрь эмбриона и окружает карманами онкобласты (рис. 5, *а*, *б*). Сформированное лезвие окружено вытянутой тонкой частью онкобласта. Лезвие не проникает клеточную мембрану онкобласта. Мембрана онкобласта с небольшими прослойками цитоплазмы, прилегающими к поверхности лезвия, всегда видна на поперечных срезах через крючок на всех этапах его морфогенеза. Инвагинация внутренней оболочки образует вокруг лезвия крючка толстую обкладку в форме чехла (рис. 2, *а*; 5, *в*, *г*). Внутренняя поверхность этого чехла везде гладкая, за исключением его наиболее дистального отдела, где имеются немногочисленные анастомозирующие микроворсинки (рис. 2, *г*).

Онкобласт вытягивается, внутри него формируются рукоятка и отросток крючка. В это время появляется клеточная структура, окружающая онкобласт выше основания отростка (рис. 2, *а—в*; 5, *г*). Она образована выростом прилежащего к крючку миоцитона (рис. 3, *а*). Эта воротничкообразная структура соединена кольцеобразной септированной десмосомой с окружающим лезвие крючка чехлом, а с онкобластом — десмосомоподобным уплотнением, вероятно, являющимся дериватом экстраклеточного матрикса.

На поздней стадии морфогенеза крючка рукоятка и отросток окружены тонким слоем цитоплазмы онкобласта, содержащим вытянутое ядро. Лезвие крючка окружено мембраной онкобласта с очень тонкой прослойкой цитоплазмы между ними (рис. 2, *а—в*). Тонкая базальная пластинка окружает мембрану онкобласта, содержащего рукоятку и отросток (рис. 2, *а—в*). К ней прикреплены мышечные волокна, отходящие от основания отростка и утолщенного заднего конца рукоятки.

Железа проникновения представлена двудерным симпластом. Она состоит из двух долей, лежащих латерально вдоль онкосферы и соединенных тонким мостиком в передней части эмбриона (рис. 3, *б*). Каждая доля содержит ядро с диспергированным хроматином и компактным ядрышком. Цитоплазма железы проникновения заполнена многочисленными дисковидными, одетыми мембраной, секреторными гранулами только одного типа. Плотность гранул одинакова как в преонкосферах, так и в поздних онкосферах (рис. 3, *б*; 4, *а*, *в*, *г*; см. вкл.). Гранулярный эндоплазматический ретикулум хорошо развит как возле ядра, так и в периферической цитоплазме железы проникновения (рис. 4, *а*). Типичные цистерны комплекса Гольджи обнаружены не были. Протоки железы проникновения отходят от соединяющего ее доли мостика. Длина и число протоков варьируют в онкосферах из одного и того же членика. Некоторые из онкосфер имеют один или два коротких протока, тогда как в других число протоков может достигать 8. Как правило, короткие протоки открываются в передней части онкосферы. В онкосферах, имеющих многочисленные протоки железы проникновения, они обычно длинные и распределены от передней части до середины онкосферы. Все протоки содержат многочисленные микротрубочки. В протоках преонкосфер были обнаружены многочисленные крупные удлинённые митохондрии, тогда как протоки зрелых онкосфер заполнены главным образом секреторными гранулами (рис. 4, *б—г*).

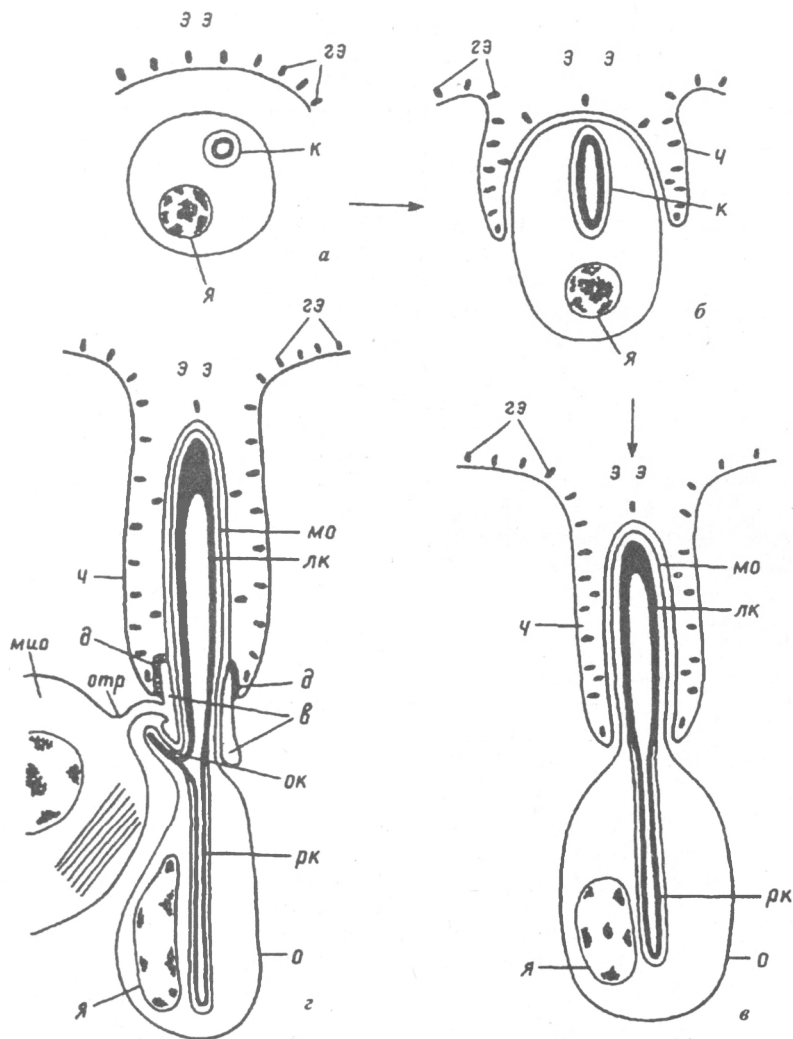


Рис. 5. Основные этапы морфогенеза крючков онкосферы *P. crenata* (схема).

а — ранний онкобласт с закладкой крючка; б — удлинение онкобласта и закладки крючка, начало формирования эпителиального чехла; в — дальнейшее удлинение структур, формирование лезвия; г — формирование отростка крючка, образование воротничка отростком миоцитона; зз — секреторные гранулы эмбрионального эпителия; лк — лезвие крючка; ок — отросток крючка; рк — рукоятка крючка; ч — чехол. Остальные обозначения такие же, как на рис. 1—4.

Fig. 5. The scheme of the hook morphogenesis process in *P. crenata*.

Все протоки железы проникновения не открываются в эмбриональный эпителий. Базальная область внутренней оболочки образует глубокие впячивания, пронизывающие эмбриональный эпителий, к которым септированными десмосомами прикрепляются окончания протоков железы проникновения (рис. 4, б—г). Эмбриональный эпителий в этих местах образует просветы. Таким образом, непосредственной связи протоков с одной из структур, окружающих эмбрион, обнаружено не было. Такая особенность ранее не была описана у онкосфер цестод, изученных к настоящему времени.

ОБСУЖДЕНИЕ

Морфогенез крючьев онкосферы у *P. crenata* происходит в специализированных клетках, онкоблестах, сходно с другими изученными цестодами (Nieland, 1968; Collin, 1968; Swiderski, 1972, 1973, 1976, 1983; Gabrion, 1981; Chew, 1983; Coil, 1991). Ультраструктура онкобластов отражает их высокую синтетическую активность: в цитоплазме наблюдаются значительная концентрация рибосом, комплексы Гольджи и скопления крупных митохондрий. Ранее было высказано предположение о прямом участии митохондрий в формировании материала крючьев (Nieland, 1968; Swiderski, 1976), однако полученные нами данные о формировании крючьев *P. crenata* не позволяют подтвердить это предположение. Интенсивное развитие микротрубочек в области формирования закладки крючьев у *P. crenata* является особенностью этого вида. Однако описанные у *Inermicapsifer madagaskariensis* электроноплотные «полоски», прикрепляющиеся к закладке крючка (Swiderski, 1976), возможно, также являются микротрубочками.

Неоднократно высказывалось мнение, что лезвие крючка после окончания своего формирования пронизывает мембрану онкоблеста и выходит из клетки наружу (Collin, 1968; Swiderski, 1973, 1976, 1983; Chew, 1983; Gabrion, 1981; Fairweather, Threadgold, 1981). У *P. crenata* сформированное лезвие, а позднее и отросток крючка не выходят из онкоблеста, а на всем протяжении морфогенеза онкосферы остаются окруженными его мембраной. Упомянутая точка зрения представляется ошибочной. В случае пронизывания поверхностной мембраны какой-либо внутриклеточной структурой неизбежно наступит нарушение мембранного потенциала и ионного баланса клетки, что приведет к гибели последней. В таком случае завершение морфогенеза крючка стало бы невозможным. Дегенерация онкоблеста после завершения формирования крючьев наблюдалась неоднократно (Collin, 1968, 1969; Pence, 1970; Swiderski, 1976, 1983). У *P. crenata* дегенерации онкоблеста не происходит. Подобное явление ранее было обнаружено у *Hymenolepis nana* (Fairweather, Threadgold, 1981). У личинок *Gyrocotyle* после вылупления мембрана онкоблеста окружает крючья до области основания отростка (Xylander, 1991). У *Dipylidium caninum* клеточная мембрана прилегает к плотному наружному слою крючка и после завершения его формирования (Pence, 1967). Кажется вероятным, что у многих цестод онкоблесты действительно дегенерируют после завершения формирования крючьев, однако до этого момента мембрана онкоблеста должна сохранять целостность и окружать формирующийся крючок.

Изучение морфогенеза крючьев *P. crenata* позволило выяснить происхождение клеточной структуры, окружающей лезвие выше основания отростка. Эта структура, обычно называемая «collar», или воротничок, была неоднократно описана у онкосфер цестод (Collin, 1968; Nieland, 1968; Pence, 1970; Swiderski, 1972, 1973, 1976, 1983; Gabrion, 1981) и у личинок *Gyrocotyle* (Xylander, 1991). Ксиландер называет ее «первой клеткой полости» и предполагает, что она является дериватом субэпителиальной закладки неодермиса. У *P. crenata* эта структура связана с близлежащим миоцитом посредством клеточного отростка, длина которого варьирует. У изученных цестод эта структура не была описана подробно. У личинок *Gyrocotyle* «воротничок» связан септированными десмосомами как с онкобластом, так и с эмбриональным эпителием, также образующим у *Gyrocotyle* чехол вокруг лезвия крючка. Обязательное присутствие этого «воротничка» у крючьев онкосфер всех изученных цестод и у личинок гирокотилид, а также постоянство его расположения позволяют предположить, что эта структура гомологична у цестод и гирокотилид и образована у них отростком миоцита.

Рукоятка и отросток крючьев зрелой онкосферы *P. crenata* сохраняют трехслойную структуру. Такую же трехслойную структуру имеют крючья онкосфер *Taenia taeniaeformis* (Nieland, 1968) и *Hymenolepis diminuta* (Pence, 1970). Наружный слой лезвия сформированных крючьев онкосферы у *P. crenata* имеет высокую электронную плотность и выглядит как продолжение средней зоны рукоятки. Двуслойная

структура крючков онкосферы описана у *Echinococcus granulosus* (Swiderski, 1983), *Dipylidium caninum* (Pence, 1967), *Catenotaenia pusilla* (Swiderski, 1972, 1973), *Inermicapsifer madagascariensis* (Swiderski, 1976). Различие в количестве слоев материала крючков в разных частях последних составляет индивидуальную особенность *P. crenata*.

Двудольная форма железы проникновения у *P. crenata* сходна с таковой у других изученных циклофиллидных цестод (Collin, 1969; Lethbridge, Gijsberg, 1974; Pence, 1970). Однако *P. crenata* существенно отличается от большинства цестод тем, что протоки железы проникновения тянутся к покровам не в области крючков, а к передней или к средней области онкосферы. Ранее переднее положение протоков железы проникновения было обнаружено у *H. nana* (Fairweather, Threadgold, 1981).

Соединение протоков железы проникновения с пронизывающими эмбриональный эпителий выростами внутренней оболочки, наблюдаемое у *P. crenata*, ранее не было описано при изучении структуры железы проникновения у онкосфер цестод. В связи с этим возникает вопрос, каким образом секрет железы проникновения выводится наружу. При решении этого вопроса важно учесть, что в онкосферах *Hymenolepis diminuta*, находящихся еще в матке, протоки железы проникновения сходно с *P. crenata* не выводят секрет в эмбриональный эпителий, с которым они связаны десмосомами. У этого вида связь протоков железы проникновения с эпителием и выведение секрета наблюдаются только после вылупления онкосфер (Lethbridge, Gijsberg, 1974). Возможно, у *P. crenata* также появляется связь протоков железы проникновения с внутренней оболочкой, с которой они соединяются после вылупления в кишечнике промежуточного хозяина. Однако в таком случае процесс проникновения у этого вида должен быть весьма своеобразным. Отсутствие прямой связи протоков железы проникновения с эмбриональным эпителием и их прикрепление к пронизывающим эмбриональный эпителий выростам внутренней оболочки онкосферы у *P. crenata* является уникальной чертой среди всех изученных цестод.

Список литературы

- Chew M. W. *Taenia crassiceps*: ultrastructural observations on the oncosphere and associated structures // Journ. Helminthol. 1983. Vol. 57. P. 101—113.
- Coil W. H. *Platyhelminthes: Cestoidea* // Microscopic anatomy of invertebrates (ed. Harrison F. W.). Vol. 3.: N. Y.: Wiley-Liss, 1991. P. 211—283.
- Collin W. K. Electron microscope studies of the muscle and hook systems of hatched oncospheres of *Hymenolepis citelli* McLeod, 1933 (Cestoda, Cyclophyllidae) // Journ. Parasitol. 1968. Vol. 54. P. 74—88.
- Collin W. K. The cellular organization of hatched oncospheres of *Hymenolepis citelli* (Cestoda, Cyclophyllidae) // Journ. Parasitol. 1969. Vol. 55. P. 149—166.
- Fairweather I., Threadgold L. T. *Hymenolepis nana*: the fine structure of the «penetration gland» and nerve cells within the oncosphere // Parasitology. 1981. Vol. 82. P. 445—458.
- Gabriel C. Recherches sur l'oncosphere des Cestodes: origine et formation de la calotte recouvrant les crochets // Zeit. Parasitenk. 1981. Vol. 65. P. 191—205.
- Lethbridge R. C., Gijsberg M. F. Penetration gland secretion by hexacanth of *Hymenolepis diminuta* // Parasitology. 1974. Vol. 68. P. 303—311.
- Nieland M. L. Electron microscope observation on the egg of *Taenia taeniaeformis* // Journ. Parasitol. 1968. Vol. 54. P. 957—960.
- Pence D. B. The fine structure and histochemistry of the infective eggs of *Dipylidium caninum* // Journ. Parasitol. 1967. Vol. 53. P. 1041—1054.
- Pence D. B. Electron microscope and histochemical studies on the eggs of *Hymenolepis diminuta* // Journ. Parasitol. 1970. Vol. 56. P. 84—97.
- Swiderski Z. La structure fine de l'oncosphere du cestode *Catenotaenia pusilla* (Goeze, 1782), (Cyclophyllidae, Catenotaeniidae) // La Cellule. 1972. Vol. 69. P. 207—237.
- Swiderski Z. Electron microscopy and histochemistry of the oncospherical hook formation by the cestode *Catenotaenia pusilla* // Intern. Journ. Parasitol. 1973. Vol. 3. P. 27—33.

- Swiderski Z. Oncospheral hook morphogenesis in the Davaineid cestode *Inermicapsifer madagaskariensis* (Davaine, 1870), Baer, 1956 // Intern. Journ. Parasitol. 1976. Vol. 6. P. 495—504.
- Swiderski Z. *Echinococcus granulosus*: hook—muscle systems and cellular organization of infestive oncospheres // Intern. Journ. Parasitol. 1983. Vol. 13. P. 289—299.
- Xylander W. E. R. Ultrastructure of the lycophora larva of *Gyrocotyle urna* (Cestoda, Gyrocotylidae). V. Larval hooks and associated tissues // Zoomorphology. 1991. Vol. 111. P. 59—66.

ЗИН РАН, Санкт-Петербург,
199034

Поступила 20.09.1998

THE MORPHOGENESIS OF ONCOSPHERAL HOOKS AND ULTRASTRUCTURE OF PENETRATION GLAND IN *PASSERILEPIS CRENATA* (CESTODA, CYCLOPHYLLIDEA)

E. E. Kornakova

Key words: Cestoda, *Passerilepis crenata* oncospheral hooks, penetration glands, ultrastructure, development.

SUMMARY

The formation of oncospheral hooks in the embryos of *Passerilepis crenata* precedes embryophore formation and full separation of embryonic epithelium. The cytoplasm of the early oncoblast contains numerous free ribosomes, large mitochondria, Golgi complex and abundant microtubules. The hook anlage consists of three layers: the outer granular zone, a middle fibrous layer of more high electron density and crystalloid central core. Later the outer granular zone of the blade becomes electron dense too. Numerous microtubules are situated along longitudinal axis of the hook anlage. When the hook anlage becomes elongate the microtubules seem to be joined to the surface of the handle. The extensive development of microtubules associated with hook anlage in *P. crenata* seems to be similar to the electron-dense «streaks» in the zone of active keratinization of hooks in *Inermicapsifer madagaskariensis* (Swiderski, 1976). Numerous large mitochondria were observed in oncoblasts during all stages of hook development but their direct role in hook formation (Nieland, 1968; Swiderski, 1976) was not ascertained.

At the process of the hook morphogenesis a part of the inner envelope lately undergoing the separation to form the embryonic epithelium gives a deep invaginations into the embryo surrounding the oncoblasts. The formed blade does not penetrate the cellular membrane of the oncoblast. This membrane is adjacent to the blade encircling it. The routine point of view exists about the penetration of the oncoblast membrane by the blade after its full formation (Collin, 1968; Swiderski, 1973, 1976, 1983; Chew, 1983; Gabrion, 1981; Fairweather, Threadgold, 1981). In *P. crenata* the formed blade does not project the cellular membrane of the oncoblast but is surrounded by it during the hook development. The penetration of cell membrane by any intracellular structure must cause the destruction of the cell in consequence of breaking of the ion balance and membrane potential. Invagination of the inner envelope forms a thick cytoplasmic sheath around the blade. Oncoblast elongates and forms guard and handle of the hook. At that time the cellular structure, usually named collar, surrounding the hook above the base of the guard appears. In *P. crenata* this structure is formed by the process of adjacent myocytosis. This collar is joined to the embryonic epithelium by the circular septate desmosome. Desmosome-like structure exists between collar and oncoblast formed by the concentration of electron-dense material. At the last stage of hook morphogenesis the oncoblast does not degenerate. It is thin cytoplasmic layer with elongated nucleus surrounding the handle and encircling the blade and guard as adjacent membrane.

The penetration gland consists of two large lobes situated laterally within the oncosphere and joined together by a narrow isthmus. The ducts of penetration gland begin from the isthmus. Oncospheres have one or two short ducts, or up to eight long ducts. The short ducts open at the anterior half of the oncosphere while the long ducts usually are withdrawn to the middle line of the oncosphere. The bilobed form of the penetration gland of the oncospheres of *P. crenata* resembles that of some other cyclophyllidean cestodes (Lethbridge, Gijsberg, 1974; Collin, 1969; Pence, 1970). However, it differs in that the ducts from the gland do not open in the hooks region of the oncosphere

but open in the anterior end or in the middle area of the oncosphere. Previously the anterior position of the penetration gland ducts were found in *H. nana* only (Fairweather, Threadgold, 1981). Moreover the absence of the connection of penetration gland ducts with the embryonic epithelium and their anchoring to the protrusions of the inner envelope is unique feature among all cestode species studied thus far. The cytoplasm of penetration gland is filled by the abundant discoid membrane-limited secretory granules of one type only with the same density as in the preoncosphere as in the oncosphere.

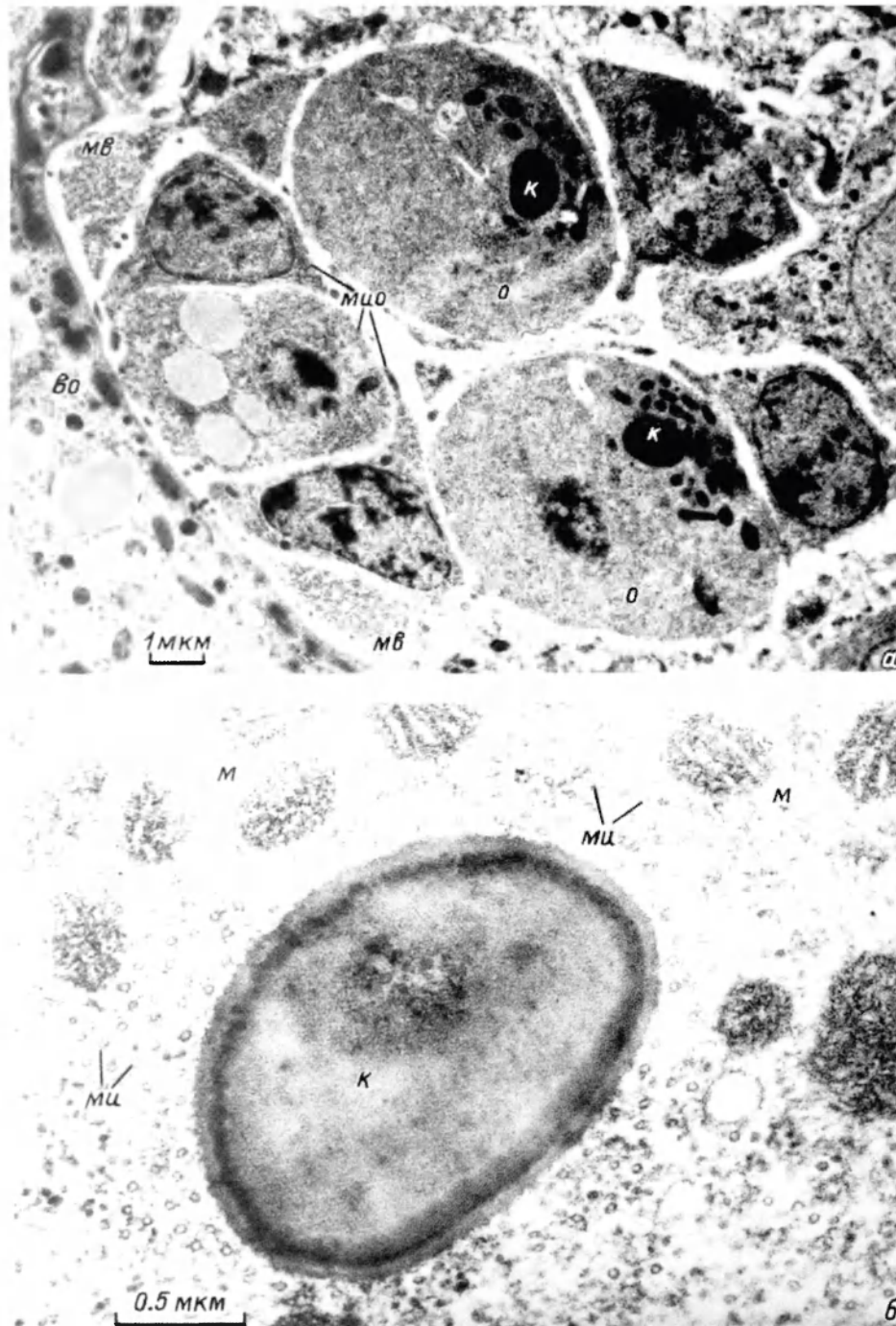


Рис. 1. Ультраструктура ранних онкобластов *P. crenata*.

a — онкобласты в ранней онкосфере; *б* — трехслойная закладка крючка, окруженная микротрубочками; *во* — внутренняя оболочка; *к* — закладка крючка; *м* — митохондрии; *мв* — мышечные волокна; *ми* — микротрубочки; *мио* — миоцитоны; *о* — онкобласты; *я* — ядро.

Fig. 1. The ultrastructure of early onco-blasts in *C. pipiens*.

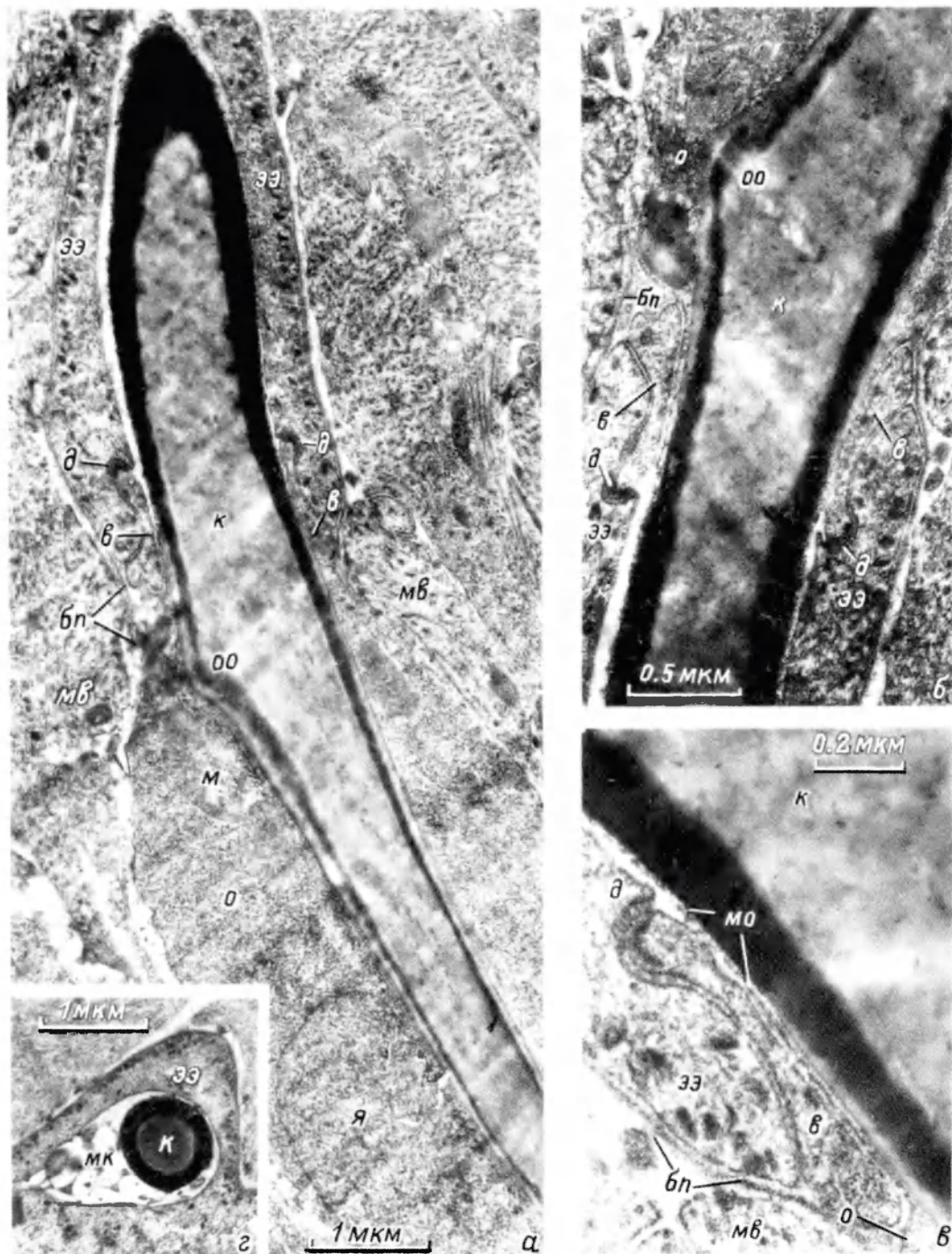


Рис. 2. Морфогенез крючков онкосферы *P. crenata*.

а — продольный срез через область формирования крючка; б — область отхождения отростка и связанные с ней структуры; в — «воротничок» крючка онкосферы; г — микроворсинки на поверхности дистальной области эпителиального чехла; бп — базальная пластинка; в — «воротничок»; д — десмосома; к — крючок; мк — микроворсинки; мо — мембрана онкобласти; оо — основание отростка; 33 — часть внутренней оболочки, впоследствии образующей эмбриональный эпителий. Остальные обозначения такие же, как на рис. 1.

Fig. 2. The morphogenesis in oncospherical hooks in *P. crenata*.

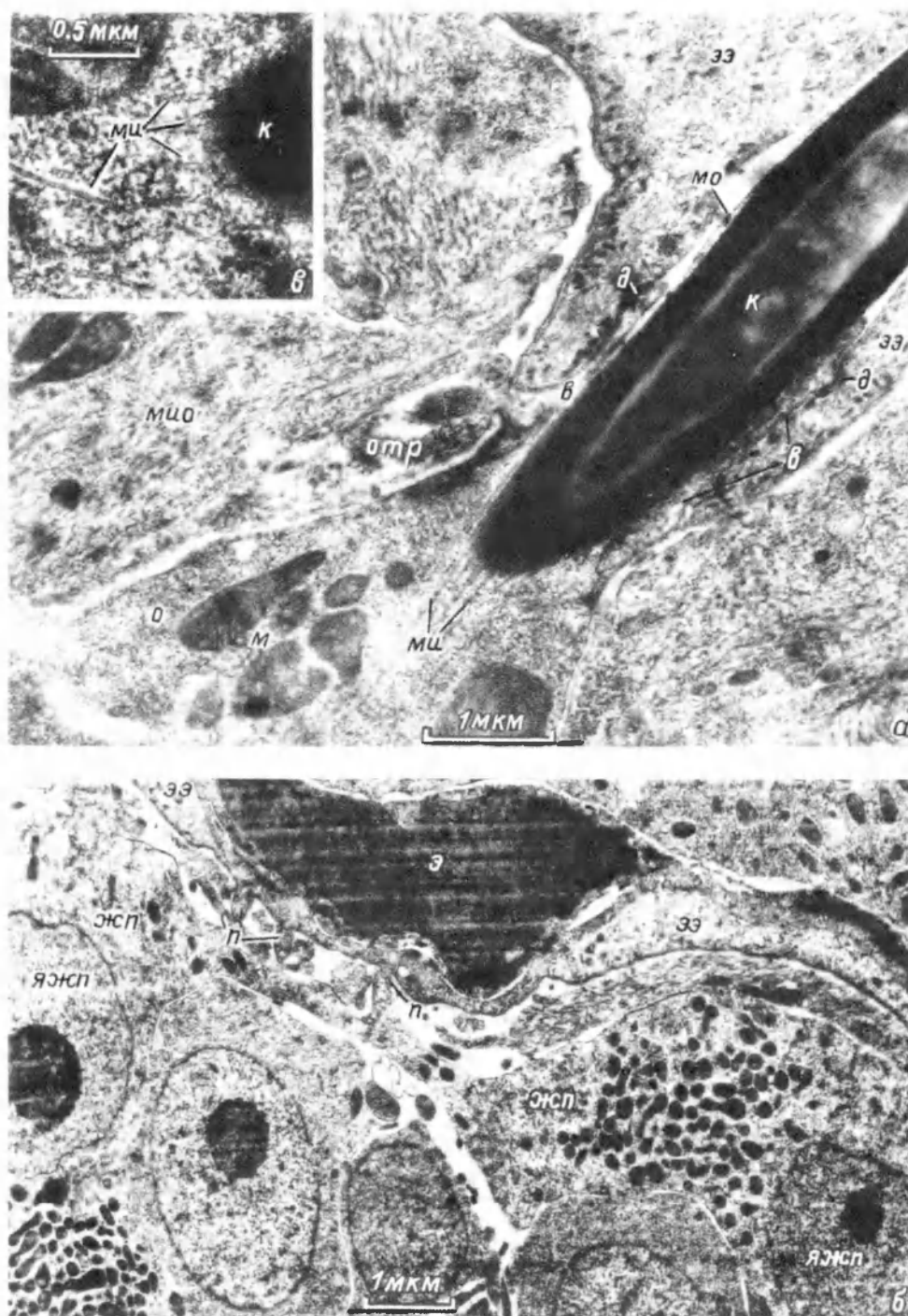


Рис. 3. Ультраструктура крючков онкосферы и железы проникновения *P. crenata*.
 а — формирование воротничка отростком миоцитона; б — железа проникновения; в — связь микротрубочек с поверхностью проксимальной области рукоятки крючка; жл — железа проникновения; отр — отросток миоцитона, образующий воротничок; п — проток железы проникновения.
 Остальные обозначения такие же, как на рис. 1 и 2.

Fig. 3. The ultrastructure of the oncospherical hooks and penetration gland in *P. crenata*.

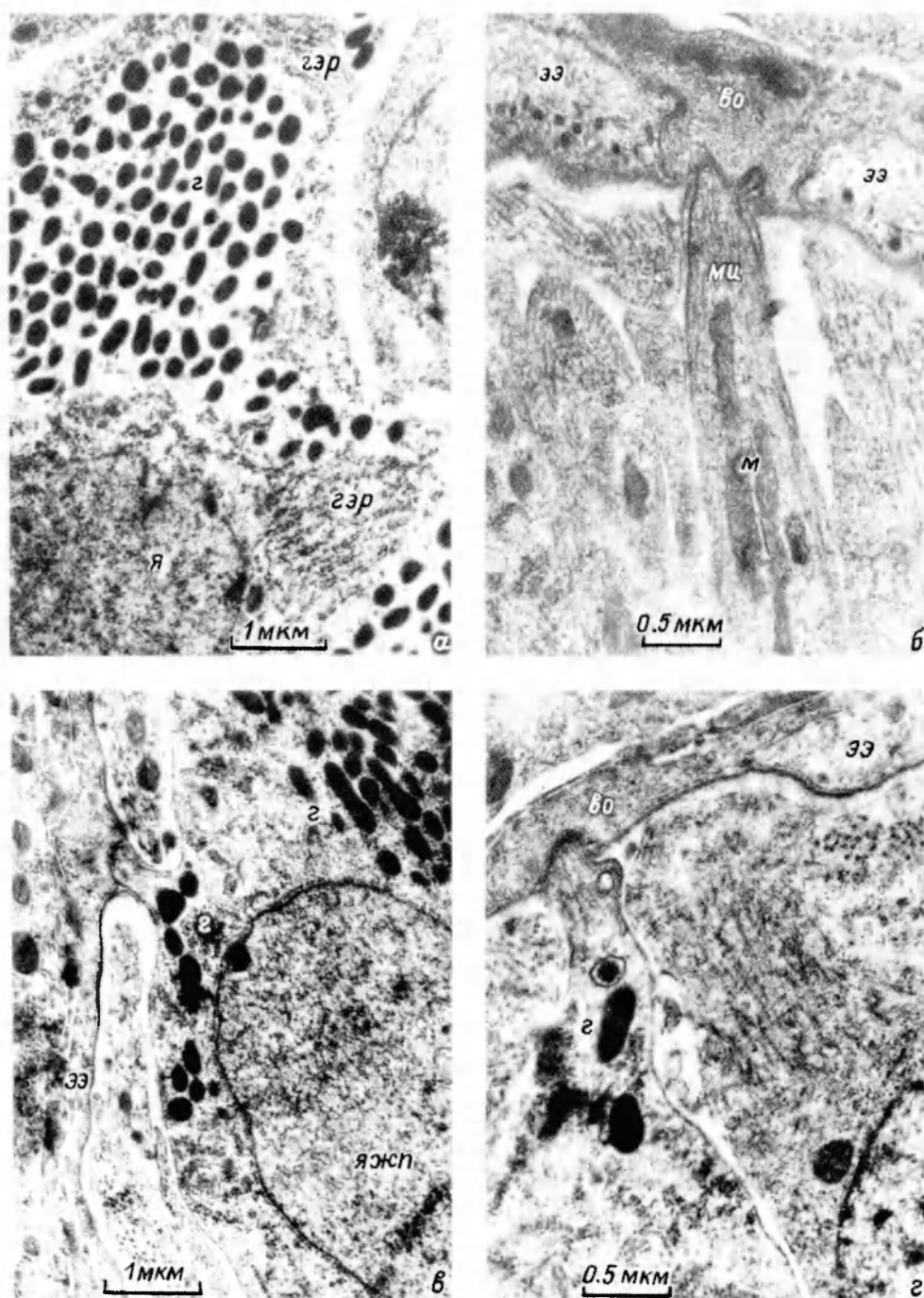


Рис. 4. Ультраструктура железы проникновения и ее протоков.

a — ультраструктура цитоплазмы железы проникновения; *б* — проток железы проникновения незрелой онкосферы; *в*, *г* — протоки желез проникновения зрелых онкосфер; *во* — внутренняя оболочка; *г* — секреторные гранулы; *гэр* — гранулярный эндоплазматический ретикулум.
Остальные обозначения такие же, как на рис. 1—3.

Fig. 4. The ultrastructure of the penetration gland and its processes.